

(19) [Publication Office]

Japan Patent Office (JP)

(12) [Kind of Document]

Japan Unexamined Patent Publication

(11) [Publication Number of Unexamined Application]

Japan Unexamined Patent Publication 2004-155688 (P2004-155688A)

(43) [Publication Date of Unexamined Application]

2004-06-03

(43) [Publication Date of Unexamined Application]

2004-06-03

(54) [Title of Invention]

Synthetic Peptide Having Chaperone Activity, Method for Measuring Decarboxylation Thereof, Pharmaceutical
For Transmissible Spongiform Encephalopathy, and Research Measurement Method Therefor

(51) [International Patent Classification, 7th Edition]

C07K7/08 A61K38/00 A61P25/28 A61P43/00 G01N33/15 G01N33/50

G01N33/68

[FI] C07K7/08 A61P25/28 A61P43/00111 G01N33/15Z G01N33/50Z G01N33/68
A61K37/02

[Theme Code (For Reference)]

2G045 4C084 4H045

[F Term (For Reference)]

2G045AA40 2G045BB51 2G045DA20 2G045DA36 2G045FB01 2G045GC 10

4C084AA02 4C084AA06 4C084BA 01 4C084BA 08 4C084BA 18 4C084BA 23

4C084CA59 4C084DC50 4C084NA14 4C084ZA152 4C084ZA162 4C084ZA182

4C084ZC022 4H045AA10 4H045AA30 4H045BA 16 4H045EA20 4H045EA50

4H045FA10

[Number of Claims] 10

[Form of Application] OL

[Number of Pages in Document] 22

[Request for Examination] Unrequested

(21) [Application Number]

Japan Patent Application 2002-321436 (P2002-321436)

(22) [Application Date] 2002-11-05

[Priority Application Number] 2002128976

[Priority Date] 2002-04-30

[Priority Country] JP

[Priority Application Number] 2002200884

[Priority Date] 2002-07-10

[Priority Country] JP

[Priority Application Number] 2002268260

[Priority Date] 2002-09-13

[Priority Country] JP

(71) [Applicant]

[Identification Number] 502154441

[Name] KK BIOFRONTIER RESEARCH LABORATORY

[Address] Kanagawa Prefecture Sagamihara City Nishihashimoto 5- 4-21

(72) [Inventor]

[Name] NUMAO, Naganori

[Address] Tokyo Machida City Hara-machi *** 5- 2-17

(74) [Attorney (s) Representing All Applicants]

[Identification Number] 100090273

[Patent Attorney]

[Name] Kokubun Takayoshi

[Problems to be Solved by the Invention]

To provide a new synthetic peptide having a molecular chaperone activity, to provide a pharmaceutical for transmissible spongiform encephalopathy, to provide a method for researching the same, and the like.

[Means to Solve the Problems]

Amino acid sequence Val-Pro-Val-Ala-Pro-Gly-Ala-Pro-Ala-Ala-Pro-Ala-X(1) [where (X(1) is Asp or Glu] peptide, or Ile-Ser-X(2)-Gly-Ser-Gly-X(3)-Thr-Trp-Ser-Asn-X(4)-Tyr [where X(2), X(3) and X(4) are Asp , Glu or Arg]. Peptide at least in part adds to peptide which comprises Lys-Thr-Asn-Met-Lys-His-Met-Ala-Gly-Ala-Ala-Ala-Gly-Ala-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Gly of the amino acid sequence derived from prion protein, such that decarboxylation activity of peptide of the latter can be observed.

[Selected Drawing] none

[Claims]

[Claim 1]

A synthetic peptide comprising the sequence: Val-Pro-Val-Ala-Pro-Gly-Ala-Pro-Ala-Ala-Pro-Ala-X(1) where X(1) is Asp or Glu, where the synthetic peptide possesses chaperone activity.

[Claim 2]

A synthetic peptide comprising the sequence: Ile-Ser-X(2)-Gly-Ser-Gly-X(3)-Thr-Trp-Ser-Asn-X(4)-Tyr or Tyr-X(4)-Asn-Ser-Trp-Thr-X(3)-Gly-Ser-Gly-X(2)-Ser-Ile, where X(2), X(3)and X(4) are Asp, Glu or Arg, where the synthetic peptide possesses chaperone activity.

[Claim 3]

The N-terminal portion of aforementioned amino acid sequence begining with NH₂ or NHCOCH₃, in Claim 1 or 2, with C-terminal being COOH or CONH₂, and where the stated synthetic peptide possesses chaperone activity.

[Claim 4]

An amino acid sequence comprising: Ile-Ser-X(2)-Gly-Ser-Gly-X(3)-Thr-Trp-Ser-Asn-X(4)-Tyr or Tyr-X(4)-Asn-Ser-Trp-Thr-X(3)-Gly-Ser-Gly-X(2)-Ser-Ile where X(2), X(3) and X(4) are Asp, Glu or Arg, which may be used for purposes of a measurement method, to measure decarboxylation activity, when added to a buffer which includes trifluoro-ethanol and oxalo-acetate.

[Claim 5]

A peptide having an amino acid sequence derived from a prion protein, comprising: Lys-Thr-Asn-Met-Lys-His-Met-Ala-Gly-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Ala-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Gly or Gly-Leu-Gly-Gly-Val-Val-Ala-Gly-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Ala-Met-His-Lys-Met-Asn-Thr-Lys, which may be used for purposes of a measurement method, to measure decarboxylation activity when added to a buffer which includes synthetic peptide and oxalo acetate which stated peptide comprises at least in part, the peptides stated in the any one claim of Claims 1 through 3.

[Claim 6]

A measurement method for measuring decarboxylation activity, as stated in Claim 4 or 5, using peptide with a designated N- terminal of aforementioned amino acid sequence as being NH₂ or NHCOCH₃, and with designated C-terminal as being COOH or CONH₂.

[Claim 7]

A pharmaceutical drug for transmissible spongiform encephalopathy, designated as the synthetic peptide stated in any one claim of Claims 1 through 3.

[Claim 8]

An amino acid sequence derived from the amino acid sequence prion protein, comprising the sequence Lys-Thr-Asn-Met-Lys-His-Met-Ala-Gly-Ala-Ala-Ala-Gly-Ala-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Gly or Gly-Leu-Gly-Gly-Val-Val-Ala-Gly-Ala-Ala-Ala-Gly-Ala-Met-His-Lys-Met-Asn-Thr-Lys, used for purposes of a research method for screening pharmaceutical drugs for transmissible spongiform encephalopathy, designating any peptide which possesses such sequence at least in part.

[Claim 9]

A research method for screening pharmaceutical drugs for transmissible spongiform encephalopathy, as stated in Claim 8, which peptide is designated to have an N-terminal of aforementioned amino acid sequence as being NH₂ or NHCOCH₃, and a C-terminal as being COOH or CONH₂.

[Claim 10]

A research method for screening pharmaceutical drugs for transmissible spongiform encephalopathy, designating an amphipathic amino acid sequence which includes a basic amino acid such as a lysine residue as at least one of the amino acid residues.

[Description of the Invention]

[0001]

[Technological Field of Invention]

This invention relates to a pharmaceutical drug for transmissible spongiform encephalopathy and a research method for measuring decarboxylation activity of novel synthetic peptide which possesses chaperone activity, comprising a partial amino acid sequence of prion protein.

[0002] [Prior Art]

There is strong request from society for development of a treatment drug for transmissible spongiform encephalopathy such as Creutzfeldt-Jakob illness [sukureipi], or bovine spongiform encephalopathy. (K.T. Adjou et al., CNS Drugs 10:83-89 [1998]). Several low-molecular weight compounds have been developed so far, but it is desired that compounds with such activity have better effectiveness and fewer side effects.

[0003]

As described by F.E.Cohen and S.B.Prusiner [Annu. Rev. Biochem. 67:793-819 (1998)], transmissible spongiform encephalopathy may involve a polypeptide chaperone (protein X), or polymeric form of the chaperone [C. Soto et al., Lancet 355(9199):192-7 (2000); C. Soto et al., Biochem Biophys Res Commun. 226(3):672-80 (1996)]. Furthermore, conversion from normal form of human (or mouse) prion protein (PrPc) to the contagious form (PrPsc) is reported using a synthetic peptide (iPrP-13) consisting of 13 amino acid residues.

[0004]

In order to develop a short chain peptide of low molecular weight as an organic compound which possesses desired molecular chaperone activity, a random screening method was adopted, with substituting an amino acid residue within an existing amino acid sequence which possesses biological activity. With using methods from earlier studies, paying attention to characteristics of amino acid residues, such methods replaced an amino acid residue with another which has similar properties. In addition, there are also alterative methods using -CH(2)-NH-, -CH=CH-, -NHCO- to produce conversion by amidation reaction , to produce acetylation of the peptide bond (-CONH-), or acetylation of the C-terminal or the N-terminal, or by introducing cysteine residues into suitable location , changing the linear structure to a cyclic structure , or from cyclic to linear type, in addition by exchanging L- amino acid residues with D- amino acid residues, or by constructing inverse sequence peptides. [B.L Lie et al., Biol Pharm Bull. 19(12):1602-6 (1996)].

[0005]

For example, as reported by C. Soto et al (op. cit.) such methods can be used to produce peptides that block conversion to the beta-sheet conformation.

[0006]

The relevance of contagious prion protein (PrPsc) to transmissible spongiform encephalopathy is argued by many researchers, but a precise connection with normal prion protein (PrPc) function other than via the stress response proteins remains unclear. However, from studies of synthetic peptides made from the prion protein using trifluoro-ethanol, it is presumed (although not proven) that such connection might reveal decarboxylation activity vis-a-vis the oxalo-acetate (Japan Unexamined Patent Publication 2002-22736 disclosure).

[0007]

[Problems to be Solved by the Invention]

An objective of this invention is to provide a compound for a method of measuring [or detecting] transmissible spongiform encephalopathy using a synthetic peptide, by measuring decarboxylation activity concomitant with molecular chaperone activity, and to provide a research method for same.

[0008]

[Means to Solve the Problems]

A peptide discovered by this inventor, as the result of diligent investigation, comprises the amino acid sequence R4NH-Lys-Thr-Asn-Met-Lys-His-Met-Ala-Gly-Ala-Ala-Ala-Gly-Ala-Val-Val-Gly-Leu-Gly-COR5 as derived from the amino acid sequence of prion protein (Sequence Number 13 in sequence table) or R4NH-Gly-Leu-Gly-Gly-Val-Val-Ala-Gly-Ala-Ala-Ala-Gly-Ala-Met-His-Lys-Met-Asn-Thr-Lys-COR5 (Sequence Number 14 in sequence table) (where R4 denotes hydrogen atom or acetyl group , and R5 denotes OH or NH2) where either of these amino acid sequences is shown by using measures of trifluoro-ethanol (TFE), to determine whether decarboxylation activity of oxalo-acetate is promoted. Furthermore, as for amino acid sequence amino acid sequence R1NH-Val-Pro-Val-Ala-Pro-Gly-Ala-Pro-Ala-Ala-X(1)-COR2 (Sequence Number 10 in sequence table) (where X(1) denotes Asp or Glu , and where R1 denotes hydrogen atom or acetyl group , and where R2 denotes OH or NH2), or as for R3NH-Ile-Ser-X(2)-Gly-Ser-Gly-X(3)-Thr-Trp-Ser-Asn-X(4)-Tyr-COR4 (Sequence Number 11 in sequence table) or R3NH-Tyr-X(4)-Asn-Ser-Trp-Thr-X(3)-Gly-Ser-Gly-X(2)-Ser-Ile-COR4 (Sequence Number 12 in sequence table) (where X(2), X(3) and X(4) denotes Asp , Glu or Arg, and where R1 denotes hydrogen atom or acetyl group , and where R2 denotes OH or NH2). For any of the foregoing peptides, as compared with added chlorpromazine, it can be determined whether decarboxylation activity of oxalo-acetate is promoted, which can be discovered even with the absence of TFE, by which discovery this invention was completed.

[0009]

Furthermore, X(1) may denote Asp , and X(2), X(3) and X(4) may denote Asp or Arg, as additional desirable embodiments.

[0010]

In addition, a research method for drugs for transmissible spongiform encephalopathy relates to the invention of this application, using any of the above-mentioned synthetic peptides, or designating that an amphipathic amino acid sequence as for example which occurs in calcitonin, with at least one or more basic amino acid lysine residues.

[0011]

[Embodiment of the Invention]

The synthesis of peptides according to this invention may be accomplished using an activated ester method , mixed acid anhydride method, azide method or other C-terminus activation method , carbodiimide or other coupling method, or an N-carboxy anhydride (NCA) method, with an oxidation and reduction method or solid phase synthesis method or other method.

[0012]

Replacing the said peptide as active ingredient with the peptide of this invention concerns a molecular chaperone agent which it includes, or which combines with said peptide , by means of which it is possible to include a physiologically acceptable salt of the above-mentioned peptide , as the active ingredient as physiologically acceptable salt, or alkali inorganic acid or organic acid , for example sodium hydroxide, calcium hydroxide, magnesium hydroxide, potassium hydroxide, hydrochloric acid, sulfuric acid, phosphoric acid, acetic acid , citric acid , tartaric acid , lactic acid , oleic acid , fumaric acid, etc.

[0013]

The prescribed peptide or its salt may, according to this invention, be made for oral or parenteral delivery, and for treatment or prevention.

[0014]

The prescribed peptide can be made into a powder, granule, capsule, tablet or other solid preparation or syrup, elixir or other liquid state for formulation as an oral dosage agent. In addition, it can be made injectable, for rectal administration, for an external skin preparation, for an inhalant, or for parenteral administration. These formulations following conventional methods, by adding manufacturing processes by which the active ingredient in pharmacological may be produced. Furthermore, it is also possible to make an increased retention formulation, with known technology.

[0015]

A solid preparation for oral dosage is produced, using active ingredient and a vehicle, for example lactose, starch, crystalline cellulose, calcium lactate, sodium metasilicate aluminate magnesium, anhydrous silicic acid, etc; and by mixing or making a powder , or with wet type or dry type granulation using sucrose [hidorokishi puropiru seruroosu], poly vinyl pyrrolidone chain or other binder [karuboki shimechiru seruroosu], including [karubokishi mechiruseruro osukarushiumu] or other disintegrating granulating agent to make tablets. These powder and granule pill-making processes must be done using magnesium stearate ** [or other substances], including talc or other lubricant. The granule or tablet sheath may be made with an enteric base , such as hydroxymethyl cellulose phthalate, methacrylic acid, methyl methacrylate copolymer, or made with other enteric sheath formulation, such as ethyl cellulose, carnauba wax, or hydrogenated oil to make an increased retention formulation. In addition, capsules produced may be filled with powder, or with granules or other hard capsules after melting active ingredient in glycerin, polyethylene glycol chain, sesame oil, olive oil etc. The sheath may also be made with gelatin film to make a soft capsule.

[0016]

A liquid state formulation for oral dosage is produced using the active ingredient and melting sucrose, sorbitol, glycerin or other sweetener in water, to makes an elixir of transparent syrup. Furthermore, by using an essential oil, with ethanol etc, it is possible to make an emulsion or suspension, by including gum arabic, tragant, polysorbate 80, [karubokishi mechiruseruro osunatoriumu] etc. These liquid state formulations may include desired flavoring, colorant, preservative etc

[0017]

An injectable form is produced with hydrochloric acid, sodium hydroxide, lactic acid, sodium lactate, sodium hydrogen phosphate **, or with sodium dihydrogen phosphate ** or with other pH adjustment agent, sodium chloride, fructose or other isotonic agent, which melts the active ingredient in injectable distilled water, produced using sterile filters, and filled ampoules, or by lyophilizing under vacuum. Furthermore, by using mannitol, dextrin, cyclodextrin, gelatin, etc it is possible to produce an injectable form of soluble type. An active ingredient emulsifying agent may include lecithin, polysorbate 80, polyoxyethylene hardening ** to make an injectable emulsion.

[0018]

A rectal administration agent is produced by humidifying active ingredient and cacao butter, aliphatic acid and base for triglyceride, polyethylene glycol chain or other suppository sink that is packed in type and cools, or after melting active ingredient in polyethylene glycol chain, soybean oil etc, with a sheath of gelatin film.

[0019]

An external skin preparation is produced by adding active ingredient to the white vaseline, beeswax, liquid paraffin, polyethylene glycol chain etc, humidifying or kneading the combination to make an ointment, or rosin , using alkyl acrylate ester polymer or other adhesive and kneading the combination after spreading/displaying or extending with a polyethylene or other nonwoven fabric.

[0020]

An inhalant is produced with active ingredient in freon gas or other propellant melting or dispersing, or filled in a pressure resistant vessel as an aerosol agent.

[0021]

A dose of peptide of this invention differs depending upon age, body weight and disease of patient (cattle, sheep or other animal including) of transmissible spongiform encephalopathy , but usually with per day approximately 1 to 500 mg , divided into one or several dosage times , as desirable to prescribe.

[0022]

Below, the invention is explained more concretely, on the basis of a Working Example, but not limited to this. In addition, protein which has amino acid sequence of synthetic peptide which applies this activity measurement method to the total length of an amino acid sequence of all kinds of prion protein, possesses chaperone activity according to the present invention, making use of known amino acid characteristics or other taxonomy and (40% or higher) homology, the claims of this invention include utilizing an amino acid sequence entirely or portion thereof to include an amino acid sequence where homology is high, for the same objectives (i.e., treatment, or prevention of transmissible spongiform encephalopathy or development of diagnostics). Furthermore, as for this activity measurement method , as for being able to utilize the method also for, prevention of transmissible spongiform encephalopathy or research method for a drug or diagnostic, it is not something where application method is limited in the this working example.

[0023]

[Working Example (s)]

First, various synthetic peptides were prepared.

Synthetic peptides used for this working example are shown in the below-mentioned Table 1.

[0024] [Table 1]

	SEQUENCE
1	GIGKFLKKAKKFAKAFVKILKK-CONH2
2	LAKLLKALAKLLKK-CONH2
3	KTNMKHMAGAAAAGAVVGGLG-COOH
4	GLGGVVAGAAAAGAMHKMNTK-COOH
5	DAPAAPAGPAVPV-COOH
6	VPVAPGAPAAPAD-COOH
7	ISRGSGRTWSNRY-COOH
8	ISDGSGDTWSNDY-COOH
9	CH3CONH-KTNMKHMAGAAAAGAVVGGLG-COOH

[0025]

As described in the publications of prior art [A. Iwahori et al., Biol Pharm Bull. 20(3):267-70 (1997); K. Johnsson et al., Nature 365(6446):530-2. (1993); G. Forloni et al., Nature 362(6420):543-6 (1993); C. Soto et al., Lancet 355(9199):192-7 (2000)] the amino acid sequences in Sequence Numbers 1, 2, 3 and 5 are public knowledge. Amino acid sequences in Sequence Numbers 4, 6, 7, 8 and 9 are included in claims of this invention. In addition, for amino acid sequence which are stated in Sequence Number 1,2,3,4 and 9, at least one amphipathic amino acid sequence may be included, such as exists in calcitonin, with basic amino acid lysine residues or other amino acid.

[0026]

Next, decarboxylase activity measurement was done. This measurement method is as follows. 2.98 mM oxalo acetate (1.7 ml ; 50mM MOPS, 0.15M NaCl, pH 7.5) with trifluoro-ethanol (TFE) (0.2 ml) by addition to a spectroscope cell, at room temperature, and with 5 min agitation. Adding 0.1 ml of measured sample of 2.0 mM concentration to solution of after stirring,, to obtain a reaction solution total amount of 2 ml, at room temperature, with 1 minute agitation (Iuchi, HS-3B, rotation speed 4). After that, churning was stopped, absorbance at 285 nm was measured with using a spectroscope (Ultraspec3100pro, Amersham Biosciencescorp.). A sample of Sequence Number 2 (0.2 mM) was used as control sample.

[0027]

After starting the reaction, absorbance was reduced for an amino acid sequence as stated in Sequence Number 2, after 2500 seconds. Similarly, absorbance was reduced for oxalo-acetate using amino acid Sequence Number 2. Concerning test peptide (Sequence Number 1, 3, 4, 5, 6 , 7 and 8) absorbance was reduced similarly, with the relative ratio activity for amino acid sequences in Sequence Number 2 of test peptide with below-mentioned Mathematical Formula 1.

[0028]

[Mathematical Formula 1]

$$[\dots] = (c-b) / (a-b)$$

[0029]

This measurement result is shown in Table 2

[0030]

[Table 2]

*****	*****
1	0.32
2	1.00
3	0.12
4	0.12
5	0.02
6	0.04
7	NT
8	NT
9	NT

[0031]

As for amino acid sequences stated in Sequence Number 3 and 4, from TFE existing at the start of the reaction, it became clear from this result that these sequences possessed decarboxylation activity.

[0032]

Next, chaperone activity measurement of synthetic peptide was done. This measurement method is as follows. 2.98 mM oxalo-acetate (1.7 ml ; 50mM MOPS, 0.1 5M NaCl, pH 7.5) with TFE (0.2 ml) added to a spectroscope cell, at room temperature, with agitation for 5 min, adding 0.1 ml to the measurement sample of 2.0 mM concentration to solution of after stirring,, to obtain a reaction solution total amount as 2 ml, at room temperature, with 1 minute agitation (Iuchi, HS-3B, rotation speed 4). After that, churning was stopped, and absorbance at 285 nm was measured with a spectroscope (Ultraspec 3100pro, Amersham Biosciencescorp.). Amino acid sequence (0.2 mM) stated in 2.0 mM Sequence Number 3 (or 4) was used as a control sample. Absorbance was reduced after starting the reaction for Sequence Number 3, after 2500 seconds. Similarly, absorbance was reduced for oxalo-acetate using Sequence Number 3.

[0033]

Next, a sample of 0.2 ml test peptide (Sequence Number 5, 6 ,7 or 8) was added in place of TFE of the above-mentioned operation, and agitated for 5 min at room temperature. Then , adding 0.1 ml of sample (Sequence Number 3) of 2.0 mM concentration to solution of after stirring ,to obtain a reaction solution total amount of 2 ml, at room temperature, with 1 minute of agitation (Iuchi, HS-3B, rotation speed 4). After stopping churning, absorbance at 285 nm was measured with the spectroscope. Relative ratio activity for amino acid sequence which is stated in Sequence Number 3 (or 4) of test peptide with below-mentioned Mathematical Formula 2 was sought.

[0034]

[Mathematical Formula 2]

$$[\dots] = (f-e) / (d-e)$$

[0035]

this measurement result is shown in Table 3 .

[0036]

[Table 3]

試料	相対活性
配列番号 3 (200 μM) + TFE	1.00
配列番号 4 (200 μM) + TFE	1.00
配列番号 3 (200 μM) + 配列番号 5 (100 μM)	0.12
配列番号 3 (200 μM) + 配列番号 5 (200 μM)	0.38
配列番号 3 (200 μM) + 配列番号 6 (100 μM)	0.42
配列番号 3 (200 μM) + 配列番号 6 (200 μM)	0.44
配列番号 3 (200 μM) + 配列番号 7 (100 μM)	NT
配列番号 3 (200 μM) + 配列番号 7 (200 μM)	NT
配列番号 3 (200 μM) + 配列番号 8 (100 μM)	NT
配列番号 3 (200 μM) + 配列番号 8 (200 μM)	NT

[0037]

From this result, as for peptide (Sequence Number 6) of this invention, it became clear to have possessed chaperone activity.

[0038]

Furthermore, chaperone activity measurement of a synthetic peptide was done with another method. This measurement method is as follows. In spectroscope cell, 2 mM Sequence Number 3 (or 4) (0.2 ml), in mixed solution of buffer (50 mM MOPS, 0.15M NaCl, pH 7.0) (1.4 ml), was agitated for 48 hours (Iuchi, HS-3B, rotation speed 4) at room temperature including 2 mM measurement sample (Sequence Number 5, 6, 7, 8) (0.2 ml). A total amount of 2.0 ml was obtained after stirring, adding 2.98mM oxalo-acetate (0.2 ml), and then furthermore with 1 minute agitation. Churning was stopped, and absorbance measured at 285 nm at 5000 second after the starting the reaction, using a spectroscope (Ultraspec3100pro, Amersham Biosciences Corp.). As a control sample, absorbance measured with Sequence Number 3 with trifluoro-ethanol (TFE) existing was designated as 1.00.

[0039]

This measurement result is shown in Table 4.

[0040]

[Table 4]

	相対活性
配列番号 3 (200 μM) + TFE (+)	1.00
配列番号 3 (200 μM) + TFE (-)	0.59
配列番号 4 (200 μM) + TFE (+)	0.70
配列番号 4 (200 μM) + TFE (-)	0.54
配列番号 3 (200 μM) + 配列番号 5 (200 μM)	0.62
配列番号 3 (200 μM) + 配列番号 6 (200 μM)	0.60
配列番号 3 (200 μM) + 配列番号 7 (200 μM)	0.65
配列番号 3 (200 μM) + 配列番号 8 (200 μM)	0.57

[0041]

From this result, as for peptide (Sequence Number 6 and 7) of this invention it became clear to have possessed chaperone activity.

[0042]

Next, decarboxylation activity measurement was done using another different method. This measurement method is as follows. In a spectroscope cell, 2 mM Sequence Number 9 (0.2 ml), in mixed solution of buffer (50 mM MOPS, 0.1 5M NaCl, pH 7.0) (1.4 ml), is agitated for 48 hours (Iuchi, HS- 3B, rotation spe< 4) with room temperature including TFE (0.2 ml). An obtained total amount of 2.0 ml including, after stirring, 2.98mM oxalo acetate (0.2 ml), is furthermore agitated for 1 minute. Churning is stopped, and absorbance after 5000 seconds measured with a spectroscope (UltraspecS 100pro, Amersham Biosciences Corp). As control sample, absorbance measured with Sequence Number 2 from trifluoro-ethanol (TFE) existing was designated as 1.00.

[0043]

This measurement result is shown in Table 5 .

[0044]

[Table 5]

*****	****	****
***** 2 200 μM, + TFE (+)	0.195	1.00
***** 2 200 μM + TFE (-)	0.159	
***** 9 200 μM +TFE (+)	0.169	0.61
***** 9 200 μM +TFE (-)	0.147	

[0045]

From this result, as for amino acid sequence which is stated in Sequence Number 9 under TFE existing it became clear to have possessed decarboxylation activity.

[0046]

Next, chaperone activity measurement of chlorpromazine, which is used as antipsychotic drug, was done. This measurement method is as follows. In a spectroscope cell, 2 mM Sequence Number 9 (0.2 ml), in mixed solution of buffer (50 mM MOPS, 0.15M NaCl, pH 6.0) (1.4 ml), was agitated for 48 hours (Iuchi, HS-3B, rotation speed 4) at room temperature, including 2 mM chlorpromazine. A total amount of 2.0 ml after stirring, adding 2.98mM oxalo acetate (0.2 ml), was furthermore agitated for 1 minute. Churning was stopped, absorbance measured at 285 nm after 5000 seconds after starting the reaction with a spectroscope (Ultraspec3100pro, Amersham Biosciences Corp.) As control sample, absorbance measured for Sequence Number 9 with chlorpromazine existing was designated as 1.00.

[0047]

This measurement result is shown in Table 6.

[0048]

[Table 6]

試料	相対比活性
クロルプロマジン (200 μM) (pH6.0)	1.00
緩衝溶液中のオキサロアセートの自己分解 (pH6.0)	1.00
配列番号9 (200 μM) +クロルプロマジン (200 μM) (pH6.0)	1.31

[0049]

From this result, as for chaperone activity measurement method of this invention it became clear to be able to search low molecular weight organic compound as treatment drug for transmissible spongiform encephalopathy.

[0050]

[Effects of the Invention]

Above-mentioned peptide has molecular chaperone activity, and possesses application for treatment, prevention or diagnostic for transmissible spongiform encephalopathy.

[0051] [Sequence]

<110> BioFrontier Institute Inc. [BioFrontier Kenkyusho KK]

<120> Synthetic Peptide with Chaperone Activity

<130> IY04651

<140>

<141> IP 2002-128976 2002-4-30

IP 2002-200884 2002-7-10

IP 2002-268260 2002-9-13

<160> NO OF <210> SEQ ID NOS : 14

<170> Patent In Ver. 2.1

<210> SEQ ID NO 1

<211> LENGTH: 22

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<220>

<223> Topology is normal chain type

<400> 1

Gly Ile Gly Lys Phe Leu Lys Lys Ala Lys Lys Phe Ala Lys Ala Phe

1 5 10 15

Val Lys lie Leu Lys Lys

20

<210> SEQ ID NO 2

<211> LENGTH: 14

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<220>

<223> Topology is normal chain type

<400> 2

Leu Ala Lys Leu Leu Lys Ala Leu Ala Lys Leu Leu Lys Lys

1 5 10

<210> SEQ ID NO 3

<211> LENGTH: 21

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<220>

<223> Topology is normal chain type

<400> 3

Lys Thr Asn Met Lys His Met Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val

1 5 10 15

Val Gly Gly Leu Gly

20

<210> SEQ ID NO 4
<211> LENGTH: 21
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Peptide
<220>
<223> Topology is normal chain type
<400> 4
Gly Leu Gly Gly Val Val Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Met His
1 5 10 15
Lys Met Asn Thr Lys
20

<210> SEQ ID NO 5
<211> LENGTH: 13
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Peptide
<220>
<223> Topology is normal chain type
<400> 5
Asp Ala Pro Ala Ala Pro Ala Gly Pro Ala Val Pro Val
1 5 10

<210> SEQ ID NO 6
<211> LENGTH: 13
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Peptide
<220>
<223> Topology is normal chain type
<400> 6
Val Pro Val Ala Pro Gly Ala Pro Ala Ala Pro Ala Asp
1 5 10

<210> SEQ ID NO 7
<211> LENGTH: 13
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Peptide
<220>
<223> Topology is normal chain type
<400> 7
Ile Ser Arg Gly Ser Gly Arg Thr Trp Ser Asn Arg Tyr
1 5 10

<210> SEQ ID NO 8
<211> LENGTH: 13
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Peptide

<220>
<223> Topology is normal chain type
<400> 8
Ile Ser Asp Gly Ser Gly Asp Thr Trp Ser Asn Asp Tyr
1 5 10

<210> SEQ ID NO 9
<211> LENGTH: 21
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Peptide
<220>
<223> Topology is normal chain type
<220>
<223> C- terminus is
<400> 9
Lys Thr Asn Met Lys His Met Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ala Val
1 5 10 15
Val Gly Gly Leu Gly
20

<210> SEQ ID NO 10
<211> LENGTH: 13
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Peptide
<220> PEPTIDE
<13>
Xaa represents Asp or Glu
<400> 10
Val Pro Val Ala Pro Gly Ala Pro Ala Ala Pro Ala Xaa
1 5 10

<210> SEQ ID NO 11
<211> LENGTH: 13
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Peptide
<220> PEPTIDE
<3>
Xaa represents Asp, Glu or Arg
<220> PEPTIDE
<7>
Xaa represents Asp, Glu or Arg
<220>
PEPTIDE
<12>
Xaa represents Asp, Glu or Arg
<400> 11
Ile Ser Xaa Gly Ser Gly Xaa Thr Trp Ser Asn Xaa Tyr
1 5 10

<210> SEQ ID NO 12
<211> LENGTH: 13

<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Peptide
<220>
PEPTIDE
<2>
Xaa represents Asp, Glu or Arg
<220>
PEPTIDE
<7>
Xaa represents Asp, Glu or Arg
<220>
PEPTIDE
<11>
Xaa represents Asp, Glu or Arg
<400> 12
Tyr Xaa Asn Ser Trp Thr Xaa Gly Ser Gly Xaa Ser He
1 5 10

<210> SEQ ID NO 13
<211> LENGTH: 21
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Peptide
<400> 13
Lys Thr Asn Met Lys His Met Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ala Val
1 5 10 15
Val Gly Gly Leu Gly
20

<210> SEQ ID NO 14
<211> LENGTH: 21
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Peptide
<400> 14
Gly Leu Gly Gly Val Val Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Met His
1 5 10 15
Lys Met Asn Thr Lys
20

Drawings

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-155688

(P2004-155688A)

(43) 公開日 平成16年6月3日(2004.6.3)

(51) Int.Cl. ⁷	F 1	テーマコード (参考)
C07K 7/08	C07K 7/08	ZNA 2G045
A61K 38/00	A61P 25/28	4C084
A61P 25/28	A61P 43/00	111 4H045
A61P 43/00	GO1N 33/15	Z
GO1N 33/15	GO1N 33/50	Z

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-321436 (P2002-321436)	(71) 出願人	502154441
(22) 出願日	平成14年11月5日 (2002.11.5)		株式会社ハイオフロンティア研究所
(31) 優先権主張番号	特願2002-128976 (P2002-128976)		神奈川県相模原市西橋本5-4-21
(32) 優先日	平成14年4月30日 (2002.4.30)	(74) 代理人	100090273
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 國分 幸悦
(31) 優先権主張番号	特願2002-200884 (P2002-200884)	(72) 発明者	沼尾 長徳
(32) 優先日	平成14年7月10日 (2002.7.10)		東京都町田市原町田5-2-17
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	F ターム (参考)	2G045 AA40 BB51 DA20 DA36 FB01 GC10 4C084 AA02 AA06 BA01 BA08 BA18 BA23 CA59 DC50 NA14 ZA152 ZA162 ZA182 ZC022 4H045 AA10 AA30 BA16 EA20 EA50 FA10
(31) 優先権主張番号	特願2002-268260 (P2002-268260)		
(32) 優先日	平成14年9月13日 (2002.9.13)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

(54) 【発明の名称】 シャペロン活性を有する合成ペプチド、脱炭酸活性の測定方法、伝達性海綿状脳症用薬剤及びその探索方法

(57) 【要約】

【課題】 分子シャペロン活性を有する新規な合成ペプチドや伝達性海綿状脳症用薬剤及びその探索方法等を提供する。

【解決手段】 アミノ酸配列 V₁α - P₁ρO - V₂α - A₁α - P₂ρO - G₁Y - A₂α - P₃ρO - A₃α - A₄α - P₄ρO - A₅α - X₁ (X₁は ASP 又は Glu である。) を少なくとも一部に有するペプチド、又は Ile-Ser-X₂-Gly-Ser-Gly-X₃-Thr-Thr-P-Ser-Asn-X₄-Thr (X₂、X₃ 及び X₄は ASP、Glu 又は Ala である。) を少なくとも一部に有するペプチドを、アリオン蛋白質のアミノ酸配列由来の Lys-Thr-Asn-Met-Lys-His-Met-Ala -Gly-Ala-Ala-Ala-Gly-Ala -Val -Val -Gly -Gly-Leu -Gly を少なくとも一部に有するペプチドに加えることによって、後者のペプチドの脱炭酸活性を観測することができます。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記のアミノ酸配列

Val-Pro-Val-Ala-Pro-Gly-Ala-Pro-Ala-Ala-Pro-Ala-X₁ (X₁はASP又はGluを表す。)を少なくとも一部に有することを特徴とするシャペロン活性を有する合成ペプチド。

【請求項2】

下記のアミノ酸配列

Ile-Ser-X₂-Gly-Ser-Gly-X₃-Thr-Trp-Ser-Asn-X₄-Tyr又は
Tyr-X₄-Asn-Ser-Trp-Thr-X₃-Gly-Ser-Gly-X₂-Ser-Ile

10

(X₂、X₃及びX₄はASP、Glu又はAlaである。)を少なくとも一部に有することを特徴とするシャペロン活性を有する合成ペプチド。

【請求項3】

前記アミノ酸配列のN末端がNH₂又はNHCOCH₃であり、C末端がCOOH又はCONH₂であることを特徴とする請求項1又は2に記載のシャペロン活性を有する合成ペプチド。

【請求項4】

下記のアミノ酸配列

20

Ile-Ser-X₂-Gly-Ser-Gly-X₃-Thr-Trp-Ser-Asn-X₄-Tyr又は
Tyr-X₄-Asn-Ser-Trp-Thr-X₃-Gly-Ser-Gly-X₂-Ser-Ile

(X₂、X₃及びX₄はASP、Glu又はAlaである。)を少なくとも一部に有するペプチドを、トリフロロエタノールとオキサロアセテートを含む緩衝液に加える工程を有することを特徴とする脱炭酸活性の測定方法。

【請求項5】

アリオン蛋白質のアミノ酸配列由来の下記のアミノ酸配列

30

Lys-Thr-Asn-Met-Lys-His-Met-Ala-Gly-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Ala-Val-Val-Ala-Gly-Ala-Ala-Ala-Gly-Ala-Met-His-Lys-Met-Asn-Thr-Lys

を少なくとも一部に有するペプチドを、請求項1乃至3のいずれか1項に記載の合成ペプチドとオキサロアセテートを含む緩衝液に加える工程を有することを特徴とする脱炭酸活性の測定方法。

【請求項6】

前記アミノ酸配列のN末端をNH₂又はNHCOCH₃とし、C末端をCOOH又はCONH₂とすることを特徴とする請求項4又は5に記載の脱炭酸活性の測定方法。

40

【請求項7】

請求項1乃至3のいずれか1項に記載の合成ペプチドを用いたことを特徴とする伝達性海綿状脳症用薬剤。

【請求項8】

アリオン蛋白質のアミノ酸配列由来の下記のアミノ酸配列

Lys-Thr-Asn-Met-Lys-His-Met-Ala-Gly-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Ala-Val-Val-Ala-Gly-Ala-Ala-Ala-Gly-Ala-Met-His-Lys-Met-Asn-Thr-Lys

Gly-Leu-Gly-Gly-Val-Val-Ala-Gly-Ala-Ala-Ala-Gly-Ala-Met-His-Lys-Met-Asn-Thr-Lys

50

A | α -A | α -G | Y - A | α -Met - His - Lys - Met - Asn - Thr -
Lys

を少なくとも一部に有するペプチドを用いることを特徴とする伝達性海綿状脳症用薬剤の探索方法。

【請求項9】

前記アミノ酸配列のN末端をNH₂又はNHCOCH₃とし、C末端をCOOH又はCONH₂とすることを特徴とする請求項8に記載の伝達性海綿状脳症用薬剤の探索方法。

【請求項10】

塩基性アミノ酸リジン残基を少なくとも1個含む両親媒性アミノ酸配列を用いることを特徴とする伝達性海綿状脳症用薬剤の探索方法。 10

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、アリオン蛋白質の部分アミノ酸配列（セグメント）に対してシャベロン活性を有する新規な合成ペプチド、脱炭酸活性の測定方法、伝達性海綿状脳症用薬剤及びその探索方法に関するもの。

【0002】

【従来の技術】

伝達性海綿状脳症（クロイツフェルト・ヤコブ病、スクレイパー、牛海綿状脳症など）の治療薬の開発には、社会からの強力な要請がある。これまでに幾つかの低分子化合物が開発されてきているが、効力性と副作用の点から、より優れた活性をもつ化合物の開発が望まれている（K. T. Adjour et al.. CNS Drugs 10. 8 3-89 (1998)）。

【0003】

伝達性海綿状脳症と高分子シャベロン（Protein X）との関連性は既に指摘されているが、高分子シャベロンの単離同定には到っていない（F. E. Cohen & S. B. Prusiner. Annu. Rev. Biochem., 67, 793-819 (1998)）。但し、18個のアミノ酸残基からなる合成ペプチド（iPrP¹³）によるヒト（又はマウス）感染性アリオン蛋白質（PrP^{Sc}）の正常アリオン蛋白質（PrP^C）への変換が既に報告されている（C. Soto et al.. Lancet 355, 192-197 (2000), C. Soto et al.. Biochem. Biophys. Chem. Commun., 226, 672-680 (1998)）。

【0004】

所望の分子シャベロン活性を有する短鎖ペプチド又は低分子有機化合物を開発するために、生物活性を有する既存のアミノ酸配列中のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換するという方法や自然界からのランダムスクリーニング方法が採用される。例えば、前者の方法では、その配列中のアミノ酸残基の親媒性に着目して、似たような性質をもつほかのアミノ酸残基に入れ替える。また、N末端のアセチル化、C末端のアミド化、あるいはペプチド結合（-CONH-）を-CH₂-NH-、-CH=CH-、-NHCO-のように変換したり、適当な位置に2つのシステイン残基を導入して直線型から環状型にしたり、あるいはその逆方向（環状型から直線型）へ変換したり、またL-アミノ酸残基をD-アミノ酸残基と交換したりする改変方法もある。更に、新しい1つの合成方法として、天然型アミノ酸配列の逆配列合成法もある（B-L. Lie et al.. Biol. Pharm. Bull., 19, 1602-1606 (1996)）。

【0005】

そのような既知手段の中で、SotoらはiPrP¹³の逆配列ペプチドに関する分子シャベロン活性を全く言及していない（C. Soto et al.. Lancet 355, 192-197 (2000), C. Soto et al.. Biochem. Biophys. Chem. Commun., 226, 672-50

680 (1996).

【0006】

感染性アリオン蛋白質(PrP^{Sc})と伝達性海綿状脳症との関連性は多くの研究者に挙げて議論されているが、正常なアリオン蛋白質(PrP^{C})については、銅結合蛋白質やストレス応答蛋白質以外の機能は不明である。但し、アリオン蛋白質の部分ペプチドがトリフロロエタノール存在下、オキサロアセテートに対して脱炭酸活性を発現するかもしれないことが推測されているが実証されていない(特開2002-22736号公報)。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、分子シャペロン活性を有する新規なシャペロン活性を有する合成ペプチド、脱炭酸活性の測定方法、伝達性海綿状脳症用薬剤及びその探索方法を提供することである。

10

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者は鋭意検討した結果、アリオン蛋白質のアミノ酸配列由来のアミノ酸配列 $R^4\text{N}-\text{H}-\text{Lys}-\text{Thr}-\text{Asn}-\text{Met}-\text{Lys}-\text{His}-\text{Met}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Ala}-\text{Ala}-\text{Ala}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Val}-\text{Val}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Leu}-\text{Gly}-\text{COR}^5$ (配列表中の配列番号13)又は $R^4\text{NH}-\text{Gly}-\text{Leu}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Val}-\text{Val}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Ala}-\text{Ala}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Met}-\text{His}-\text{Lys}-\text{Met}-\text{Asn}-\text{Thr}-\text{Lys}-\text{COR}^5$ (配列表中の配列番号14)(R^4 は水素原子又はアセチル基であり、 R^5 はOH又は NH_2 である。)で表されるアミノ酸配列の何れか1つが、トリフロロエタノール(TFE)存在下で、オキサロアセテートの脱炭酸活性を促進することを見出し、更にそのアミノ酸配列はアミノ酸配列 $R^1\text{NH}-\text{Val}-\text{Pro}-\text{Val}-\text{Ala}-\text{Pro}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Pro}-\text{Ala}-\text{Ala}-\text{Pro}-\text{Ala}-X_1-\text{COR}^2$ (配列表中の配列番号10)(X_1 はASP又はGluであり、 R^1 は水素原子又はアセチル基であり、 R^2 はOH又は NH_2 である。)で表されるペプチドか、又は $R^3\text{NH}-\text{Ile}-\text{Ser}-X_2-\text{Gly}-\text{Ser}-\text{Gly}-X_3-\text{Thr}-\text{Thr}-\text{Ser}-\text{Asn}-X_4-\text{Thr}-\text{COR}^4$ (配列表中の配列番号11)若しくは $R^3\text{NH}-\text{Thr}-X_4-\text{Asn}-\text{Ser}-\text{Thr}-\text{Thr}-\text{Thr}-X_3-\text{Gly}-\text{Ser}-\text{Gly}-X_2-\text{Ser}-\text{Ile}-\text{COR}^4$ (配列表中の配列番号12)(X_2 、 X_3 及び X_4 はASP、Glu又はA α であり、 R^1 は水素原子又はアセチル基であり、 R^2 はOH又は NH_2 である。)で表されるペプチドのうち何れか1つのペプチド又はクロルアロマシンを加えると、TFE非存在下でも、オキサロアセテートの脱炭酸活性を促進することを見出し、本発明を完成させた。

20

【0009】

更に好みの態様としては、 X_1 はASP、 X_2 、 X_3 及び X_4 はASP又はA α である。

30

【0010】

また、本願発明に係る伝達性海綿状脳症用薬剤の探索方法は、上記のいずれかの合成ペプチドを用いるか、又はカルシトニン等の塩基性アミノ酸リジン残基を少なくとも1個含む両親媒性アミノ酸配列を用いることを特徴とする。

40

【0011】

【発明の実施の形態】

本発明のペプチドは活性化ヒステル法、混合酸無水物法、アシド法などのC端活性化法、カルボジミドなどのカッフリング法、N-カルボキシ無水物(NCA)法、酸化還元法あるいは固相合成法等の方法により合成することができます。

【0012】

本発明のペプチドの有効成分として含む分子シャペロン剤においては該ペプチドに代えてあるいは該ペプチドと共に、上記のペプチドの生理学的に許容される塩を有効成分として含んでいてもよく、生理学的に許容される塩としてはアルカリ、無機酸または有機酸、例

50

えは水酸化ナトリウム、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム、水酸化カリウム、塩酸、硫酸、磷酸、酢酸、クエン酸、酒石酸、乳酸、オレイン酸、ファーマル酸等との塩を挙げることができる。

【0013】

本発明におけるペフチドまたはその塩は治療または予防のための経口的あるいは非経口的に投与することができる。

【0014】

経口投与剤としては散剤、粒剤、カプセル剤、錠剤などの固形製剤あるいはシロップ剤、エリキシル剤などの液状製剤とすることができます。また、非経口投与剤としては注射剤、直腸投与剤、皮膚外用剤、吸入剤とすることができます。これらの製剤は活性成分に薬学的に認容できる製造助剤を加えることにより常法に従って製造される。更に、公知の技術により持続性製剤とすることも可能である。10

【0015】

経口投与用の固形製剤を製造するには活性成分と賦形剤、例えば乳糖、澱粉、結晶セルロース、乳酸カルシウム、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、無水ケイ酸などを混合して散剤とするか、更に必要に応じて白糖、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルビロリドンなどの結合剤、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウムなどの崩壊剤などを加えて湿式または乾式造粒して粒剤とする。錠剤を製造するにはこれらの散剤及び粒剤をそのままあるいはステアリン酸マグネシウム、タルクなどの滑沢剤を加えて打錠すればよい。これらの粒または錠剤はヒドロキシメチルセルロースフタレート、メタアクリル酸、メタアクリル酸メチルコポリマーなど腸溶性基剤で被覆して腸溶性製剤、あるいはエチルセルロース、カルナウバロウ、硬化油などで被覆して持続性製剤とすることもできる。また、カプセル剤を製造するには散剤又は粒剤などの硬カプセルに充填するか、活性成分をグリセリン、ポリエチレングリコール、ゴマ油、オリーブ油などに溶解したのちセラチン膜で被覆し軟カプセルとすることもできる。20

【0016】

経口投与用の液状製剤を製造するには活性成分と白糖、ソルビトール、グリセリンなどの甘味剤とを水に溶かして透明なシロップ剤、更に精油、エタノールなどを加えてエリキシル剤とするか、アラビアゴム、トラガント、ポリソルベート80、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどを加えて乳剤または懸濁剤としてもよい。これらの液状製剤には所望により着色剤、保存剤などを加えてもよい。30

【0017】

注射剤を製造するには活性成分を必要に応じて塩酸、水酸化ナトリウム、乳酸、乳酸ナトリウム、リン酸一水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウムなどのpH調整剤、塩化ナトリウム、アドウ糖などの等張化剤とともに注射用蒸留水に溶解し、無菌ろ過してアンフルに充填するか、更にマンニトール、デキストリン、シクロデキストリン、セラチンなどを加えて真空下凍結乾燥し、用事溶解型の注射剤としてもよいし、活性成分にレシチン、ポリソルベート80、ポリオキシエチレン硬化 麻子油などを加えて水中で乳化せしめ注射用乳剤とすることもできる。

【0018】

直腸投与剤を製造するには活性成分及びカカオ脂、脂肪酸のモノ、ジ及びトリグリセリド、ポリエチレングリコールなどの坐剤用基剤とを加湿して溶融し、型に流し込んで冷却するか、活性成分をポリエチレングリコール、大豆油などに溶解したのちセラチン膜で被覆すればよい。40

【0019】

皮膚外用剤を製造するには活性成分を白色ワセリン、ミツロウ、流動パラフィン、ポリエチレングリコールなどに加えて必要ならば加湿して練合し軟膏剤とするとか、ロジン、アクリル酸アルキルエステル重合体などの粘着剤と練合したのちポリエチレンなどの不織布に展延してテープ剤としてもよい。

【0020】

吸入剤を製造するには活性成分をフロンガスなどの噴射剤に溶解または分散して耐圧容器に充填しエアソール剤としてもよい。

【0021】

本発明のペプチドの投与量は伝達性海綿状脳症の患者（牛、羊などの動物も含め）の年齢、体重及び病態に依ってことなるが、通常一日当たり約1～500mгであり、1乃至数回に分けて投与することが望ましい。

【0022】

以下に、本発明について、実施例に基づいて具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。また、本活性測定方法を全種アリオン蛋白質の全長アミノ酸配列に応用したり、アミノ酸親媒性などの分類法に関する既知知見を用いて蛋白質データベース等から本発明のシャペロン活性を有する合成ペプチドのアミノ酸配列と相同性の高い（40%以上）配列を持つ蛋白質を探索し、その相同性の高いアミノ酸配列を含む該蛋白質のアミノ酸配列全体又は部分を同一目的（例えば、伝達性海綿状脳症の治療、予防又は検査薬の開発）に利用することも容易に類推でき、本発明範囲に含まれる。更に、本活性測定法は、伝達性海綿状脳症の治療、予防又は検査用の薬剤の探索方法にも利用できることは明白であり、その用途法が本実施例に限定されるものではない。

10

【0023】

【実施例】

先ず、種々の合成ペプチドを準備した。本実施例に用いた合成ペプチドは下記表1に示すとおりである。

20

【0024】

【表1】

配列番号	アミノ酸配列
1	GIGKFLKKAKKFAKFVKILKK-CONH ₂
2	LAKLLKALAKLLKK-CONH ₂
3	KTNMKHMAGAAAAGAVVGGLG-COOH
4	GLGGVVAGAAAAGAMHKMNTK-COOH
5	DAPAAPAGPAVPV-COOH
6	VPVAPGAPAAPAD-COOH
7	ISRGSGRTWSNRY-COOH
8	ISDGSGDTWSNDY-COOH
9	CH ₃ CONH-KTNMKHMAGAAAAGAVVGGLG-COOH

30

【0025】

配列番号1、2、3及び5に記載のアミノ酸配列は公知である（A. Iwahori et al., Biol. Pharm. Bull. 20, 267-270 (1997); K. Johnsson et al., Nature 365, 580-582 (1993); G. Forloni et al., Nature 362, 543-546 (1993); C. Soto et al., Lancet 355, 192-197 (2000)）。一方、配列番号4、6、7、8及び9に記載のアミノ酸配列は本発明範囲に含まれるものである。また、配列番号1、2、3、4及び9に記載のアミノ酸配列は、塩基性アミノ酸リジン残基を少なくとも1個含む両親媒性アミノ酸配列であり、このような両親媒性アミノ酸配列としては、他にカルシトニンが挙げられる。

40

【0026】

50

次に、脱炭酸酵素活性測定を行った。この測定方法は以下のとおりである。2.98 mM オキサロアセテート(1.7 ml; 50 mM MOPS, 0.15 M NaCl, pH 7.5)とトリフルオロエタノール(TFE)(0.2 ml)を分光器セルに加え、室温で、5分間した。その後、その溶液に2.0 mM濃度の測定用サンプルを0.1 ml 加えて反応溶液全量を2 mlとし、室温で、1分間(Iuchi, HS-3B, 回転スピード4)した。その後、を停止し、分光器(Ultronaspec 3100Pro, Amersham Biosciences corp.)で285 nm の吸光度を測定した。対照サンプルとしては2.0 mM配列番号2(0.2 mM)を用いた。

【0027】

10

反応開始後、2500秒後の配列番号2に記載のアミノ酸配列存在下での吸光度減少量aを求めた。同様にして、配列番号2に記載のアミノ酸配列非存在下でのオキサロアセテートの吸光度減少量bを求めた。試験ペアチド(配列番号1、3、4、5、6、7及び8)についても同様にして吸光度減少量cを求め、下記の式により試験ペアチドの配列番号2に記載のアミノ酸配列に対する相対比活性を求めた。

【0028】

【数1】

$$\text{相対比活性} = (c - b) / (a - b)$$

20

【0029】

この測定結果を表2に示す。

【0030】

【表2】

配列番号	相対比活性
1	0.32
2	1.00
3	0.12
4	0.12
5	0.02
6	0.04
7	NT
8	NT
9	NT

30

【0031】

この結果より配列番号3及び4に記載のアミノ酸配列はTFE存在下脱炭酸活性を有していることが明らかとなった。

【0032】

次に、合成ペアチドのシャベロン活性測定を行った。この測定方法は以下のとおりである。2.98 mMオキサロアセテート(1.7 ml; 50 mM MOPS, 0.15 M NaCl, pH 7.5)とTFE(0.2 ml)を分光器セルに加え、室温で、5分間した。その後、その溶液に2.0 mM濃度の測定用サンプルを0.1 ml 加えて反応溶液全量を2 mlとし、室温で、1分間(Iuchi, HS-3B, 回転スピ

50

ード4)した。その後、 を停止し、分光器(Ultronaspec 8100Pro Amer sham Biosciences corp.)で285nmの吸光度を測定した。対照サンプルとしては2.0mM配列番号3(又は4)に記載のアミノ酸配列(0.2mM)を用いた。反応開始後、2500秒後の配列番号3に記載のアミノ酸配列存在下での吸光度減少量dを求めた。同様にして、配列番号3に記載のアミノ酸配列非存在下でのオキサロアセテートの吸光度減少量eを求めた。

【0033】

次に、上記操作のTFEの代わりに試験ペプチド(配列番号5、6、7又は8)を0.2mI加え、室温で5分間 した。 後、その溶液に2.0mM濃度の測定用サンプル(配列番号3)を0.1mI加えて反応溶液全量を2mIとし、室温で、1分間(Iuchi, H8-3B, 回転スピード4)した。 を停止後、分光器で285nmの吸光度減少量fを測定した。下記の式により試験ペプチドの配列番号3(又は4)に記載のアミノ酸配列に対する相対活性を求めた。

【0034】

【数2】

$$\text{相対活性} = (f - e) / (d - e)$$

【0035】

この測定結果を表3に示す。

20

【0036】

【表3】

試料	相対比活性
配列番号3 (200 μM) + TFE	1.00
配列番号4 (200 μM) + TFE	1.00
配列番号3 (200 μM) + 配列番号5 (100 μM)	0.12
配列番号3 (200 μM) + 配列番号5 (200 μM)	0.38
配列番号3 (200 μM) + 配列番号6 (100 μM)	0.42
配列番号3 (200 μM) + 配列番号6 (200 μM)	0.44
配列番号3 (200 μM) + 配列番号7 (100 μM)	NT
配列番号3 (200 μM) + 配列番号7 (200 μM)	NT
配列番号3 (200 μM) + 配列番号8 (100 μM)	NT
配列番号3 (200 μM) + 配列番号8 (200 μM)	NT

10

20

40

【0037】

この結果より、本発明のペプチド（配列番号6）はシャペロン活性を有していることが明らかとなつた。

【0038】

更に、他の方法により、合成ペプチドのシャペロン活性測定を行つた。この測定方法は以下のとおりである。分光器セル中、2 mM配列番号3（又は4）（0.2 ml）、緩衝液（50 mM MOPS, 0.15 M NaCl, pH 7.0）（1.4 ml）の混合溶液に、2 mM測定用サンフル（配列番号5, 6, 7, 8）（0.2 ml）を加え、室温で48時間（Iuchi, HS-3B, 回転スピード4）した。後、2.98 mMオキサロアセテート（0.2 ml）を加えて全量を2.0 mlとし、更に1分間

した。を停止し、分光器（Ultraspec 3100 Pro, Amersham Biosciences corp.）で285 nmの吸光度減少量を反応開始後5000秒間測定した。対照サンフルとしては、測定用サンフル非存在下、トリフロロエタノール（TFE）存在下の配列番号3で測定した吸光度減少量を1.00とした。

【0039】

この測定結果を表4に示す。

【0040】

【表4】

試料	相対比活性
配列番号3 (200 μM) + TFE (+)	1.00
配列番号3 (200 μM) + TFE (-)	0.59
配列番号4 (200 μM) + TFE (+)	0.70
配列番号4 (200 μM) + TFE (-)	0.54
配列番号3 (200 μM) + 配列番号5 (200 μM)	0.62
配列番号3 (200 μM) + 配列番号6 (200 μM)	0.60
配列番号3 (200 μM) + 配列番号7 (200 μM)	0.65
配列番号3 (200 μM) + 配列番号8 (200 μM)	0.57

10

20

30

【0041】

この結果より、本発明のペプチド（配列番号6及び7）はシャベロン活性を有していることが明らかとなった。

【0042】

次に、上記の方法とは異なる方法により、脱炭酸活性測定を行った。この測定方法は以下のとおりである。分光器セル中、2 mM配列番号9 (0.2 ml)、緩衝液 (50 mM MOPS, 0.15 M NaCl, pH 7.0) (1.4 ml) の混合溶液に、TFE (0.2 ml) を加え、室温で48時間 (Iuchi, HS-3B, 回転スピード4) した。後、2.98 mMオキサロアセテート (0.2 ml) を加えて全量を2.0 mlとし、更に1分間 した。を停止し、分光器 (Ultraspec 3100 Pro, Amersham Biosciences corp.) で285 nmの吸光度減少量を反応開始後5000秒間測定した。対照サンプルとしては、測定用サンプル非存在下、トリフロロエタノール (TFE) 存在下の配列番号2で測定した吸光度減少量を1.00とした。

【0043】

この測定結果を表5に示す。

40

【0044】

【表5】

試料	活性	相対比活性
配列番号 2 (200 μM) + TFE (+)	0.195	1.00
配列番号 2 (200 μM) + TFE (-)	0.159	
配列番号 9 (200 μM) + TFE (+)	0.169	0.61
配列番号 9 (200 μM) + TFE (-)	0.147	

【0045】

この結果より、配列番号9に記載のアミノ酸配列はTFE存在下で脱炭酸活性を有していることが明らかとなった。

【0046】

次に、抗精神病薬等として使用されるクロルプロマジンのシャペロン活性測定を行った。この測定方法は以下のとおりである。分光器セル中、2 mM配列番号9(0.2 ml)、緩衝液(50 mM MOPS, 0.15 MNaCl, pH 6.0)(1.4 ml)の混合溶液に、2 mM測定用サンプル(例えば、クロルプロマジン)を加え、室温で48時間(Iuchii, HS-3B, 回転スピード4)した。後、2.98 mMオキサロアセテート(0.2 ml)を加えて全量を2.0 mlとし、更に1分間した。

を停止し、分光器(Ultraspec 3100 Pro, Amersham Biosciences Corp.)で285 nmの吸光度減少量を反応開始後5000秒間測定した。対照サンプルとしては、配列番号9非存在下、探索用サンプル(クロルプロマジン)存在下で測定した吸光度減少量を1.00とした。

【0047】

この測定結果を表6に示す。

【0048】

【表6】

試料	相対比活性
クロルプロマジン(200 μM) (pH6.0)	1.00
緩衝溶液中のオキサロアセテートの自己分解(pH6.0)	1.00
配列番号9(200 μM) + クロルプロマジン(200 μM) (pH6.0)	1.31

【0049】

この結果より、本発明のシャペロン活性測定法は伝達性海綿状脳症用治療薬としての低分子有機化合物を探索できることが明らかとなった。

【0050】

【発明の効果】

上記ペプチドは分子シャペロン活性を有し、伝達性海綿状脳症の治療、予防又は検査薬としての用途を有する。

【0051】

【配列表】

10

20

30

40

〈110〉 BioFrontier Institute INC.

〈120〉 Synthetic Peptide with Chaperone Activity

〈130〉 XY04651

〈140〉

10

〈141〉

〈150〉 JP 2002-128976

〈151〉 2002-4-30

〈150〉 JP 2002-200884

〈151〉 2002-7-10

20

〈150〉 JP 2002-268260

〈151〉 2002-9-13

〈160〉 14

〈170〉 PatentIn Ver. 2.1

30

〈210〉 1

〈211〉 22

〈212〉 PRT

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

40

〈223〉 Synthetic Peptide

⟨220⟩

⟨223⟩ Topology is normal chain type

⟨400⟩ 1

Gly Ile Gly Lys Phe Leu Lys Lys Ala Lys Lys Phe Ala Lys Ala Phe

1 5 10 15

10

Val Lys Ile Leu Lys Lys

20

⟨210⟩ 2

⟨211⟩ 14

20

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ Synthetic Peptide

⟨220⟩

30

⟨223⟩ Topology is normal chain type

⟨400⟩ 2

Leu Ala Lys Leu Leu Lys Ala Leu Ala Lys Leu Leu Lys Lys

1 5 10

40

⟨210⟩ 3



〈211〉 21

〈212〉 PRT

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Synthetic Peptide

10

〈220〉

〈223〉 Topology is normal chain type

〈400〉 3

Lys Thr Asn Met Lys His Met Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ala Val

1 5 10 15

20

Val Gly Gly Leu Gly

20

〈210〉 4

〈211〉 21

〈212〉 PRT

30

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Synthetic Peptide

〈220〉

〈223〉 Topology is normal chain type

40

〈400〉 4

Gly Leu Gly Gly Val Val Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Met His
1 5 10 15

Lys Met Asn Thr Lys

20

10

〈210〉 5

〈211〉 13

〈212〉 PRT

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

20

〈223〉 Synthetic Peptide

〈220〉

〈223〉 Topology is normal chain type

〈400〉 5

Asp Ala Pro Ala Ala Pro Ala Gly Pro Ala Val Pro Val
1 5 10

30

〈210〉 6

〈211〉 13

〈212〉 PRT

〈213〉 Artificial Sequence

40

〈220〉

〈223〉 Synthetic Peptide

〈220〉

〈223〉 Topology is normal chain type

〈400〉 6

10

Val Pro Val Ala Pro Gly Ala Pro Ala Ala Pro Ala Asp

1 5 10

〈210〉 7

〈211〉 13

〈212〉 PRT

20

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Synthetic Peptide

〈220〉

〈223〉 Topology is normal chain type

30

〈400〉 7

Ile Ser Arg Gly Ser Gly Arg Thr Trp Ser Asn Arg Tyr

1 5 10

〈210〉 8

40

〈211〉 13

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ Synthetic Peptide

⟨220⟩

10

⟨223⟩ Topology is normal chain type

⟨400⟩ 8

Ile Ser Asp Gly Ser Gly Asp Thr Trp Ser Asn Asp Tyr

1 5 10

20

⟨210⟩ 9

⟨211⟩ 21

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ Synthetic Peptide

30

⟨220⟩

⟨223⟩ Topology is normal chain type

⟨220⟩

⟨223⟩ C-terminus is CH₃CONH

40

⟨400⟩ 9

Lys Thr Asn Met Lys His Met Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val

1 5 10 15

Val Gly Gly Leu Gly

20

10

⟨210⟩ 10

⟨211⟩ 13

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ Synthetic Peptide

20

⟨220⟩

⟨221⟩ PEPTIDE

⟨222⟩ (13)

⟨223⟩ Xaa represents Asp or Glu

⟨400⟩ 10

30

Val Pro Val Ala Pro Gly Ala Pro Ala Ala Pro Ala Xaa

1 5 10

⟨210⟩ 11

⟨211⟩ 13

⟨212⟩ PRT

40

⟨213⟩ Artificial Sequence



(19)



JP 2004 155688 A 2004.6.3

〈220〉

〈223〉 Synthetic Peptide

〈220〉

〈221〉 PEPTIDE

〈222〉 (3)

10

〈223〉 Xaa represents Asp, Glu or Arg

〈220〉

〈221〉 PEPTIDE

〈222〉 (7)

〈223〉 Xaa represents Asp, Glu or Arg

20

〈220〉

〈221〉 PEPTIDE

〈222〉 (12)

〈223〉 Xaa represents Asp, Glu or Arg

〈400〉 11

Ile Ser Xaa Gly Ser Gly Xaa Thr Trp Ser Asn Xaa Tyr

30

1 5 10

〈210〉 12

〈211〉 13

〈212〉 PRT

〈213〉 Artificial Sequence

40



(20)



JP 2004 155688 A 2004. 6. 3

⟨220⟩

⟨223⟩ Synthetic Peptide

⟨220⟩

⟨221⟩ PEPTIDE

⟨222⟩ (2)

⟨223⟩ Xaa represents Asp, Glu or Arg

10

⟨220⟩

⟨221⟩ PEPTIDE

⟨222⟩ (7)

⟨223⟩ Xaa represents Asp, Glu or Arg

⟨220⟩

20

⟨221⟩ PEPTIDE

⟨222⟩ (11)

⟨223⟩ Xaa represents Asp, Glu or Arg

⟨400⟩ 12

Tyr Xaa Asn Ser Trp Thr Xaa Gly Ser Gly Xaa Ser Ile

1 5 10

30

⟨210⟩ 13

⟨211⟩ 21

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ Artificial Sequence

40

⟨220⟩

<223> Synthetic Peptide**<400> 13**

Lys Thr Asn Met Lys His Met Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ala Val
1 5 10 15

Val Gly Gly Leu Gly

10

20

<210> 14**<211> 21****<212> PRT****<213> Artificial Sequence**

20

<220>**<223> Synthetic Peptide****<400> 14**

Gly Leu Gly Gly Val Val Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Met His
1 5 10 15

30

Lys Met Asn Thr Lys

20



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

G 01 N 33/50

G 01 N 33/68

F I

G 01 N 33/68

A 61 K 37/02

テーマコード（参考）